

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAURICIO BAUM

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE REPASTO SANGUÍNEO DE *Lutzomyia*
(*Nyssomyia*) *intermedia* s.l. (LUTZ & NEIVA, 1912) EM ÁREA DE
TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NO
ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

CURITIBA

2014

MAURICIO BAUM

IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE REPASTO SANGUÍNEO DE *Lutzomyia*
(*Nyssomyia*) *intermedia* s.l. (LUTZ & NEIVA, 1912) EM ÁREA DE
TRANSMISSÃO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA) NO
ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, área de
concentração em Parasitologia, Setor de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Edilene Alcântara de
Castro.

Coorientadora: Profa. Dra. Magda Clara Vieira
da Costa Ribeiro.

CURITIBA

2014

Este trabalho é dedicado aos meus pais Aldo Baum e Sônia Maria de Lima Baum, ao meu irmão Aldo Júnior Baum, aos meus A-M-I-G-O-S e colegas e a todos aqueles que contribuíram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho e por todo apoio nesta minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

O término deste curso de mestrado e a redação desta dissertação sinalizam o fim de um importante passo em minha vida, e desta forma não poderia de exprimir meus agradecimentos a todos àqueles que fizeram parte e contribuíram de maneira decisiva para este momento.

Expresso minha total gratidão aos meus pais Aldo Baum e Sônia Maria de Lima Baum, ao meu irmão Aldo Júnior Baum, que são as pessoas responsáveis pelo meu sucesso pessoal, profissional e por mais essa grandiosa conquista, pois, sem a sua ajuda, apoio, empenho, dedicação, paciência, orientação companheirismo, amizade, sabedoria e acima de tudo, seu amor, jamais conseguiria concretizar este sonho.

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Edilene Alcântara de Castro por ter confiado a mim a realização desta pesquisa, pela disponibilidade, colaboração, conhecimentos transmitidos ao longo de todo o trabalho.

Manifesto total gratidão a minha Coorientadora Professora Doutora Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro que se empenhou e se dedicou com afinco para a realização deste trabalho, pelo incentivo, pelos ensinamentos, e por me conduzir pelo caminho da Ciência, por ter me inspirado com sua Ciência e, sobretudo com suas atitudes.

Agradeço a Professora Doutora Mara Cristina Pinto da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) pela sua colaboração referente ao teste de digestão e pelas suas contribuições para esta dissertação.

A Elias Seixas Lorosa da Fundação Oswaldo Cruz pela realização do teste de precipitina.

A Guilherme A. C. Damasio pelo auxílio nas coletas e redação do artigo.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste curso de mestrado.

Agradeço também à Universidade Federal do Paraná por me possibilitar a realização do mestrado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por fomentar esta pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório que me deram apoio em vários momentos que necessitei, demonstro aqui meu profundo apreço. Além disso, estendo meus agradecimentos aos colegas dos outros laboratórios que não mediram esforços para me ajudar quando precisei.

Aos moradores da localidade de Epitácio Pessoa por nos permitirem realizar as coletas dos flebotomíneos em suas propriedades.

E por fim, mas não menos importantes, demonstro meus sinceros agradecimentos aos meus amigos pelos momentos divididos e por terem tornado meu dia-a-dia mais leve.

Não é possível vencer sozinho. **OBRIGADO A TODOS!**

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa não contagiosa causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. É uma das doenças dermatológicas que exigem mais atenção, devido à sua magnitude e risco de deformidades em humanos. No Brasil, a LTA é amplamente distribuída, com relatos de caso em todas as regiões brasileiras. O presente trabalho trata da identificação da fonte alimentar de flebotomíneos, que fornece informações valiosas sobre a interação vetor/hospedeiro e possibilita entender os mecanismos de transmissão de *Leishmania*. O objetivo do estudo foi identificar a fonte alimentar sanguínea de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l. em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado do Paraná pela técnica de precipitina e amplificação parcial e sequenciamento do gene Prepronociceptina (PNOC). Os flebotomíneos foram coletados na localidade de Epitácio Pessoa, no município de Adrianópolis, estado do Paraná. Para o teste de precipitina foram capturados 3.357 flebotomíneos, sendo 864 fêmeas, dessas 862 (99,8%) pertenciam a espécie *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l., e dois espécimes não identificados, os quais foram considerados como pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (0,2%). Do total de fêmeas analisadas, 396 apresentaram reação a algum tipo de antissoro testado, sendo a maioria do tipo simples, (67,9%) as quais se alimentaram principalmente em ave, gambá e roedor, respectivamente, mas também foram encontradas fêmeas alimentadas em sangue de humano, cão, cavalo, boi e gato. As demais apresentaram reações cruzadas (32,1%) predominando ave/roedor, ave/gambá, ave/cão, ave/humano e cavalo/cão, dentre outros. O teste de digestão mostrou que é possível detectar sangue de mamífero no conteúdo intestinal sanguíneo de flebotomíneos até 24 horas após o ingurgitamento, não sendo possível detectar após este período de tempo. Para a identificação da fonte de repasto por método molecular foram coletados 2.851 flebotomíneos durante o período do estudo, sendo 1.263 fêmeas, todas pertencentes à espécie *L. (N.) intermedia* s.l. Destas, 93 (3,26%) estavam ingurgitadas com conteúdo intestinal sugestivo para sangue. Foi possível identificar a fonte alimentar através do sequenciamento do gene PNOC em 27 fêmeas (29%) ingurgitadas com sangue, sendo que 1 (3,7%) se alimentou em cavalo (*Equus caballus*), 16 (59,3%) em porco (*Sus scrofa*) e 10 (37%) em cão (*Canis lupus familiaris*). Esses resultados mostram um comportamento alimentar eclético de *L. intermedia* s.l., podendo ser um potencial vetor de *Leishmania* na região de estudo.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l., Fonte Alimentar, Teste de Precipitina, Prepronociceptina.

ABSTRACT

The American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a noncontagious infectious disease caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania*, which affects skin and mucous membranes. It is one of dermatological diseases that require more attention due to its magnitude and risk of deformities in the human. In Brazil, ACL is widely distributed, with reports in all Brazilian regions. The bloodmeal source of sandflies provides valuable information about the vector/host interactions and allows the understanding of *Leishmania* transmission mechanisms. The aim of this study was to identify the bloodmeal source of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l. in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Paraná state by precipitin test and partial amplification and sequencing of the gene Prepronociceptin (PNOC). Sand flies were collected in the locality of Epitácio Pessoa in the city of Adrianópolis, Paraná state. For the precipitin test 3,357 sandflies were captured, being 864 females, 862 of these (99.8 %) belonged to *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l. species, and two unidentified specimens (0.2%), which were considered as belonging to the genus *Lutzomyia*. Of the total females examined, 396 had reactions to some kind of antiserum tested, most of the simple type (67.9 %), which fed mainly on birds, opossum and rodent respectively, but were also found females that fed on blood from human, dog, horse, cattle and cat. The others were cross-reactions (32.1 %) predominating bird/rodent, bird/opossum, bird/dog, bird/human and horse/dog, among others. The digestion test showed that is possible to detect mammalian blood present in the intestinal contents of sandflies 24 hours after engorgement and cannot be detected after this time. For molecular identification of the bloodmeal source, 2,851 sandflies were collected during the study period, being 1,170 females, all belonging to the species *L. (N.) intermedia* s.l. Of these, 93 (3.26 %) were engorged, with intestinal contents suggestive for blood. It was possible to identify the food source through the PNOC gene sequencing in 27 females (29 %) engorged with blood, of these 1 (3.7%) fed on horse (*Equus caballus*), 16 (59.3 %) in pig (*Sus scrofa*) and 10 (37 %) in dog (*Canis lupus familiaris*). These results show an eclectic feeding behavior of *L. intermedia* s.l., suggesting this as a potential vector of *Leishmania* in the study region.

Key words: American Cutaneous Leishmaniasis, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l., Bloodmeal Source, Precipitin Test, Prepronociceptin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DE UM FLEBOTOMÍNEO.....	21
FIGURA 2 - FLEBOTOMÍNEOS EM CÓPULA.....	22
FIGURA 3 - A) CICLO DE VIDA DE <i>Leishmania</i> NO INTESTINO DO FLEBOTOMÍNEO, EVIDENCIANDO AS DIFERENTES FORMAS DE PROMASTIGOTAS. B) CICLO DE VIDA DE <i>Leishmania</i> NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO.....	27
FIGURA 4 - A) ORGANIZAÇÃO GERAL DO GENE PNOC. B) REPRESENTAÇÃO DO CROMOSSOMO HUMANO 8 E A LOCALIZAÇÃO DO GENE PNOC.....	31
FIGURA 5 - ÁREA DE ESTUDO: EPITÁCIO PESSOA, MUNICÍPIO DE ADRIANÓPOLIS, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.....	34
FIGURA 6 - ARMADILHA DE SHANNON (A) E CDC (B).....	35
FIGURA 7 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PNOC PARA TESTAR SUA SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE.....	44
FIGURA 8 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PNOC PARA TESTAR A PRESENÇA DE INIBIDORES DE PCR.....	45
FIGURA 9 - PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PNOC PARA O TESTE DE DIGESTÃO.....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	REAÇÕES SIMPLES AOS DIFERENTES TIPOS DE ANTÍSSOROS VERIFICADOS PELO TESTE DE PRECIPITINA EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM EPITÁCIO PESSOA, ADRIANÓPOLIS, PARANÁ, BRASIL.....	43
TABELA 2	–	REAÇÕES CRUZADAS AOS DIFERENTES TIPOS DE ANTÍSSOROS VERIFICADOS PELO TESTE DE PRECIPITINA EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM EPITÁCIO PESSOA, ADRIANÓPOLIS, PARANÁ, BRASIL.....	43
TABELA 3	–	IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE REPASTO SANGUÍNEO EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM EPITÁCIO PESSOA, ADRIANÓPOLIS, PARANÁ, BRASIL, PELA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC).....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 HISTÓRICO.....	15
2.2 EPIDEMIOLOGIA	16
2.3 AGENTE ETIOLÓGICO.....	17
2.3.1 O protozoário <i>Leishmania</i>	17
2.4 TRANSMISSÃO.....	19
2.5 O INSETO VETOR	19
2.5.1 Biologia e morfologia dos flebotomíneos.....	21
2.6 TRANSMISSÃO DE <i>Leishmania</i> PELOS FLEBOTOMÍNEOS.....	24
2.7 RESERVATÓRIOS DE <i>Leishmania</i>	27
2.8 IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE REPASTO.....	28
2.9 O GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC).....	30
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 JUSTIFICATIVA.....	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 ÁREA DE ESTUDO	34
5.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS.....	35
5.2.1 Coleta de flebotomíneos para identificação da fonte de repasto sanguíneo	35
5.2.2 Coleta de flebotomíneos para criação em laboratório e teste de digestão.....	36
5.3 CRIAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS EM LABORATÓRIO.....	36
5.4 TESTE DE PRECIPITINA.....	37
5.5 TESTE DE SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE PARCIAL DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)	38
5.6 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE PARA POSSÍVEIS COMPONENTES INIBIDORES PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PNOC.....	38
5.7 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	39
5.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	39
5.9 ELETROFORESE E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR	40
5.10 SEQUENCIAMENTO.....	40
5.11 EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS	41
5.12 TESTE DE DIGESTÃO DE SANGUE DE <i>L. (L.) neivai</i> ALIMENTADAS ARTIFICIALMENTE EM HAMSTER (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	41
6 RESULTADOS.....	42
6.1 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE RESPASTO SANGUÍNEO PELO TESTE DE PRECIPITINA	42
6.2 TESTE DE SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE PARCIAL DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)	44
6.3 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE PARA POSSÍVEIS COMPONENTES INIBIDORES PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PNOC.....	44

6.4	TESTE DE DIGESTÃO DE SANGUE DE <i>L. (N.) neivai</i> ALIMENTADAS ARTIFICIALMENTE EM HAMSTER (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	45
6.5	IDENTIFICAÇÃO DE FONTE DE REPASTO SANGUÍNEO POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)	46
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES	53
9	PERSPECTIVAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as mais importantes doenças tropicais negligenciadas, e durante os últimos 10 anos as regiões endêmicas têm aumentado, assim como o número de casos da doença. Entretanto, o impacto das leishmanioses na saúde pública é subestimado. Aproximadamente dois milhões de novos casos (1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral) ocorrem anualmente, estando 12 milhões de pessoas infectadas atualmente (WHO, 2013).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença parasitária da pele e das mucosas sendo descrita em quase todos os países americanos, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção do Uruguai e do Chile (MS, 2007). No Brasil a LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras (MS, 2007), com diversos padrões epidemiológicos que podem variar de acordo com as espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão, a susceptibilidade da população humana e o nível de exposição, bem como a diversidade e a competência dos hospedeiros (BRITO *et al.*, 2012).

Mais de 40 espécies de mamíferos podem albergar *Leishmania*, podendo funcionar como seus reservatórios. Nas Américas, entre os principais grupos estão: Edentata, Carnivora, Rodentia, Primata, Marsupialia e Perissodactyla. Contudo, poucos destes animais atuam efetivamente como seus reservatórios (QUARESMA *et al.*, 2011; DANTAS-TORRES, 2007; ASHFORD, 1996).

Um dos principais objetivos de estudos em focos naturais de transmissão de *Leishmania* em todo mundo é a correta identificação dos seus reservatórios vertebrados. A grande maioria dos estudos de fonte de repasto de artrópodes tem sido realizada com vetores de patógenos de interesse em saúde pública ou veterinária, como os flebotomíneos (JAOUADI *et al.*, 2013; KENT, 2009; HAOUAS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Investigações sobre o hábito alimentar dos flebotomíneos têm grande significado ecológico e epidemiológico, possibilitando a identificação dos mamíferos, possíveis reservatórios, e do hábito alimentar do vetor. Além disso, contribui para a elucidação do ciclo de transmissão natural em determinada área e permite desenvolver estratégias para o controle da doença (QUARESMA *et al.*, 2012; ABASSI *et al.*, 2009; FONTELLES *et al.*, 2009).

Várias técnicas são utilizadas para a identificação das fontes alimentares de artrópodes vetores a fim de avaliar adequadamente a sua preferência hematofágica, dentre as quais se destacam a técnica de espectrometria de massa (SILVA, 2006), o teste de precipitina (SOUZA *et al.*, 2011; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2008; LOROSA *et al.*, 1998) e ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (MARASSÁ, *et al.*, 2013; AFONSO *et al.*, 2012), além de diversas metodologias utilizando PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (QUARESMA *et al.*, 2012; PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010; SANT'ANNA *et al.*, 2008; KENT *et al.*, 2005).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença conhecida desde a antiguidade, existindo relatos desde o século I d.C. (BASANO & CAMARGO, 2004). Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas datadas de 400 a 900 anos d.C., em estudos arqueológicos desenvolvidos em vasos de cerâmica peruanos (*huacos*), que ilustram lesões destrutivas de narinas e lábios, características da *espundia* e da *uta* (denominações locais para as formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar, respectivamente) entre os incas durante a era pré-colombiana (LAINSON, 2010; DO VALE & FURTADO, 2005). Posteriormente, foram encontradas múmias com lesões de pele e mucosas, típicas de leishmaniose (BASANO & CAMARGO, 2004).

Alexandre Cerqueira, em 1855, identificou primeiramente a moléstia e suspeitou do papel dos flebotomíneos como vetores da doença (GONTIJO & CARVALHO, 2003). O primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* foi Cunningham em 1885, na Índia, em casos de leishmaniose visceral (BASANO & CAMARGO, 2004; CHOI & LERNER, 2001). A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro “*Antiguidad de la Syphilis en el Peru*”, o qual relata a viagem do Frei Dom Hipólito Sanches de Fayasy Quiros de Tabatinga até o Peru, percorrendo as regiões do Vale Amazônico (DO VALE & FURTADO, 2005; BASANO & CAMARGO, 2004). Em 1903, Leishman publicou a identificação de um parasita no baço de um cidadão inglês que morreu de febre de Dum-Dum em Dumdum na Índia, em 1900. Alguns meses depois, Donovan descreveu organismos idênticos em uma punção esplênica de uma criança (CHOI & LERNER, 2001). Também em 1903, Ronald Ross, pesquisador militar inglês, deu o nome genérico ao parasito de *Leishmania* e, em 1911, Splendore demonstrou em lesões mucocutâneas a presença do parasita de *espundia*.

Carini, em 1912, identificou *Leishmania* em lesões da mucosa de pacientes com leishmaniose no Brasil (WHO, 2010) e, Gaspar Vianna investigou formas amastigotas em lesões cutâneas de um paciente do Estado de Minas Gerais e denominou o parasita de *Leishmania braziliensis* (LAINSON, 2010; BASANO & CAMARGO, 2004).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Endêmica em 98 países, as leishmanioses estão entre as mais importantes doenças tropicais negligenciadas. Durante os últimos 10 anos, as regiões endêmicas tiveram a sua área ampliada, com o aumento no número de registros anuais (1,5 milhões da forma tegumentar e 500.000 da forma visceral). O impacto das leishmanioses na saúde pública é subestimado, pois um número substancial de casos não é devidamente registrado, levando em consideração que a maioria das áreas endêmicas de leishmaniose está em países em desenvolvimento (85 dos 98 em que elas ocorrem) e a notificação dos casos é obrigatória em apenas um terço deles (WHO, 2013; WHO, 2010). As leishmanioses são transmitidas ao homem em ciclos silvestres, domésticos e peridomiciliares que vão desde cidades, desertos até florestas tropicais de todos os continentes, com exceção da Austrália e Antártica (BERN, *et al.*, 2008)

Dos casos de leishmaniose tegumentar no mundo, 90% ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria, sendo que na América Latina, a Colômbia ocupa o segundo lugar com mais de 15.000 casos relatados em 2005 e 2006, depois do Brasil, o qual registra 30.000 casos anuais (BERN, 2008; REITHINGER *et al.*, 2007; DESJAUX *et al.*, 2004). A epidemiologia da leishmaniose tegumentar nas Américas é complexa, a qual varia em ciclos de transmissão, hospedeiros, vetores, manifestações clínicas, resposta à terapêutica e múltiplas espécies de *Leishmania* circulando em uma mesma área geográfica, fatores que dificultam o seu controle (WHO, 2010; MS, 2007).

No Brasil, a LTA tem ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras, apresentando diferentes padrões epidemiológicos e de transmissão que podem variar de acordo com as espécies de flebotomíneos envolvidos, a susceptibilidade e o nível de exposição da população. É uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores bem como a competência e a diversidade dos hospedeiros e um conhecimento ainda limitado sobre os padrões epidemiológicos, tornam-na de difícil controle (BRITO *et al.*, 2012; MS, 2007). No país, a incidência da LTA está aumentando, no período de 1990 a 2011, foram notificados 587.962 casos de LTA, destes, 13.161 ocorreram no sul do Brasil, sendo 12.495 deles no estado do Paraná, representando 94,9% dos registros na região sul do país (MS, 2013).

No Estado do Paraná há descrição da LTA desde o início do século XIX, ocorrendo em 1917 a primeira notificação da doença, tornando-se endêmica a partir de 1980 (CURTI *et al.*, 2009) e está presente em duas áreas geográficas distintas do estado, apresentando comportamento epidemiológico diferente. Em uma das áreas, localizada no Vale do Rio Ribeira, a doença é conhecida desde o começo do século, sendo que no Município de Adrianópolis houve o primeiro registro na literatura de seis casos em 1955 (MIRANDA *et al.*, 1955). Na outra área, no norte do Paraná, têm sido assinalados casos de LTA desde o início de sua colonização (CASTRO *et al.*, 2002).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

2.3.1 O protozoário *Leishmania*

De acordo com Levine *et al.* (1980) os protozoários do gênero *Leishmania* ocupam a seguinte posição sistemática:

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866.

Sub-reino: PROTOZOA Goldfuss, 1817.

Filo: SARCHOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963.

Subfilo: MASTIGOPHORA Design, 1866.

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909.

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976.

Subordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880.

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905.

A LTA é causada por protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam ciclo de vida digenético alternando entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor, o flebotomíneo. Esses protozoários apresentam duas formas principais: uma aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados como parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (MS, 2007; COURA, 2006), e outra flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. Deve ser ressaltado que durante o ciclo de vida no intestino do inseto vetor, morfotipos distintos de promastigotas de *Leishmania* estão presentes, os quais passam de um estágio não-infectivo (amastigota) para um infectivo (promastigotas metacíclica), fenômeno conhecido como metaciclogênese (ROGERS, 2012; RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2010; KAMHAWI, 2006).

A infecção humana pode exibir diferentes manifestações clínicas dependendo principalmente das espécies de *Leishmania*, podendo ser amplamente classificadas em leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC) apresentando-se em um espectro que varia de lesão cutânea localizada, mucosa e cutânea difusa (WHO, 2010; REITHINGER *et al.*, 2007).

Cerca de 40 espécies de *Leishmania* foram descritas (RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2010), sendo que 22 dessas espécies são patogênicas para seres humanos, que se infectam acidentalmente quando expostos ao ciclo de transmissão natural (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Nas Américas, são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* em 22 países, que causam leishmaniose em humanos, desde a Península de Yucatán no México ao Norte da Argentina e Sul do Brasil (MS, 2007). Na América Latina, *L. (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 é a mais prevalente, seguida por *L. (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 e *L. (V.) guyanensis* Floch, 1954 (GOTO & LINDOSO, 2012). No Brasil, sete espécies têm sido

apontadas como agentes etiológicos da LTA: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* (BRITO *et al.*, 2012).

2.4 TRANSMISSÃO

A transmissão ocorre pela picada de fêmeas hematófagas de flebotomíneos, seguido pela regurgitação de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* na pele de um hospedeiro suscetível. Também podem ser transmitida por seringas compartilhadas entre usuários de drogas intravenosas, por transfusão de sangue e congênita, mas estes modos de transmissão são mais raros do que a vetorial (WHO, 2010). Não há transmissão de pessoa a pessoa (MS, 2007).

2.5 O INSETO VETOR

Os flebotomíneos são insetos agrupados na subordem Nematocera, ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. São conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (MS, 2007). Entre as mais de 800 espécies de flebotomíneos registradas, 98 são comprovadas ou suspeitas como vetoras de *Leishmania* que causam doença em humanos, destas 42 espécies pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, encontradas no Velho Mundo e 56 espécies agrupadas no gênero *Lutzomyia*, presentes no Novo Mundo (MAROLI *et al.*, 2013).

O termo flebotomíneo foi usado pela primeira vez pelo naturalista italiano, Filippo Bonanni, em 1691, e a primeira descrição foi feita por Scopoli, em 1786 (DEDET, 2005; LEWIS, 1977) também naturalista italiano. A primeira descrição de um flebotomíneo americano foi feita por Coquillett, em 1907. No

Brasil a descoberta das três primeiras espécies de flebotomíneos foi graças ao trabalho de Lutz e Neiva, em 1912 (DEDET, 2005).

A transmissão de *Leishmania* foi comprovada pela picada de flebotomíneos em hamster, em 1931, e a partir de então estes insetos foram formalmente incriminados como seus vetores (LAINSON *et al.*, 1986). Na literatura é possível encontrar relatos sobre a possível transmissão de *Leishmania* por outros artrópodes, contudo essas informações são, ainda, inconclusivas (DANTAS-TORRES, 2011; DOUGALL *et al.*, 2011; OTRANTO & DANTAS TORRES, 2010). Os flebotomíneos, além de transmitirem protozoários do gênero *Leishmania*, também são conhecidos por serem vetores de outros agentes patogênicos, tais como outros tripanossomatídeos, bactérias do gênero *Bartonella* e agentes virais como os das arboviroses (AFONSO *et al.*, 2012; YOUNG & DUNCAN, 1994).

Segundo KILLICK-KENDRICK (1999) a caracterização de um vetor de *Leishmania* é baseada em critérios amplamente aceitos, tais como: 1) observação de um flebotomíneo realizando hematofagia em seres humanos ou hospedeiros reservatórios; 2) desenvolvimento do parasito no intestino médio de flebotomíneos; 3) A confirmação de que a *Leishmania* de flebotomíneos naturalmente infectados são indistinguíveis daquelas isoladas a partir de seres humanos e 4) demonstração de que flebotomíneos podem transmitir *Leishmania* durante o repasto sanguíneo.

É provável que a relação *Leishmania* – Flebotomíneo começou quando flagelados do Cretáceo Inferior com características de tripanosomatídeos, foram encontrados no intestino de larvas de flebotomíneos, apoiando a hipótese de que tripanossomatídeos de vida livre poderiam ter sido adquiridos por larvas de flebotomíneos em seu ambiente de alimentação e em algum ponto no tempo, gêneros específicos foram introduzidos em vertebrados, estabelecendo assim, seu ciclo de vida (POINAR, 2007).

2.5.1 Biologia e morfologia dos flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos holometábolos, com desenvolvimento em quatro estágios: ovo, larva (quatro estádios), pupa e adulto (Figura 1) (MAROLI *et al.*, 2013; YOUNG & DUNCAN, 1994).

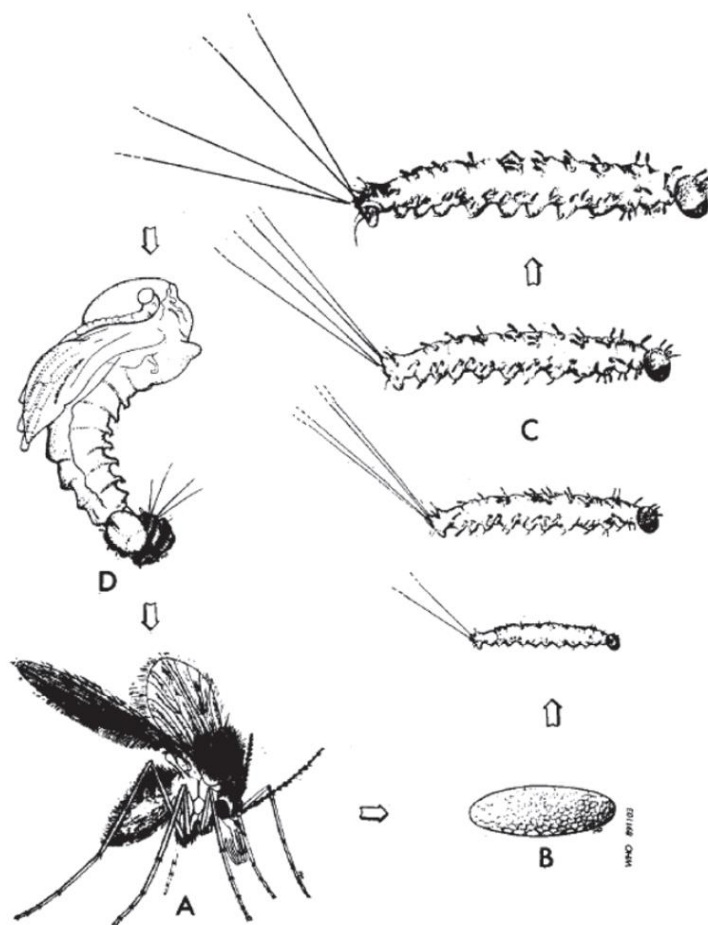


FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE UM FLEBOTOMÍNEO. A) INSETO ADULTO; B) OVO; C) QUATRO ESTÁDIOS LARVAIS E D) PUPA.
FONTE: WHO (2010)

A cópula (Figura 2) ocorre quando a fêmea está em repouso ou em voo, em que macho e fêmea se posicionam na mesma direção em sentidos opostos. O número habitual de ovos postos por uma fêmea durante a oviposição em um único ciclo varia entre 40 e 70 ou mais, essa variação é devido a espécie de

flebotomíneo, tamanho e origem do repasto sanguíneo, dieta larval, e outros fatores (YOUNG & DUNCAN, 1994; PESSÔA, 1978).



FIGURA 2. FLEBOTOMÍNEOS EM CÓPULA.
FONTE: O autor (2013)

Seus ovos são elípticos, ovoides e muito alongados, medem aproximadamente 300 a 500 μm de comprimento por 70 a 150 μm de largura, são depositados sob a forma de pequenos amontoados, aderindo ao substrato por uma substância viscosa produzida pelas glândulas acessórias, são esbranquiçados no momento da postura, mas após algumas horas tornam-se castanho-escuros. A superfície do ovo é dotada de nervuras ou outras protuberâncias, as quais são típicas da espécie ou complexo de espécies, isso mostra que os ovos podem ser utilizados para identificação específica do inseto (COSTA *et al.*, 2012; RANGEL & LAINSON, 2003; YOUNG & DUNCAN, 1994; PESSÔA, 1978).

As larvas são brancas, pequenas e de aspecto vermiforme (RANGEL & LAINSON, 2003), constituídas de 12 segmentos e passam por quatro estádios. Após a eclosão, o primeiro instar das larvas começa a se alimentar de matéria orgânica disponível no solo (YOUNG & DUNCAN, 1994; PESSÔA, 1978). Antes de se transformar em pupa, a larva elimina seu conteúdo gastrointestinal (PÊSSOA, 1978), deixa de se alimentar e sua exúvia se liga em uma de suas extremidades a um substrato sólido, dando início ao processo de metamorfose

que resultará no inseto adulto (MAROLI *et al.*, 2013; YOUNG & DUNCAN, 1994).

A pupa é semelhante a uma pequena crisálida (MAROLI *et al.*, 2013), possui coloração esbranquiçada ou amarelada, tornando-se escurecida quando próximo a emergência do inseto adulto. É constituída por 13 segmentos, sendo que os quatro primeiros constituem o cefalotórax e os demais constituem o abdômen (RANGEL & LAINSON, 2003).

Os flebotomíneos adultos são insetos pequenos, medem cerca de 2 a 3 milímetros, tem coloração acastanhada, pousam com asas abertas e seus voos são curtos. Ambos os sexos precisam de açúcar na sua dieta, sendo que vários carboidratos naturais podem participar da nutrição destes insetos, dependendo da espécie. Os principais são glicose, frutose sacarose, maltose, dentre outros. Na natureza, as principais fontes destes carboidratos são provenientes de seiva vegetal, néctar de flores e de frutos e secreções de afídeos (RANGEL & LAINSON, 2003). Apenas as fêmeas de quase todas as espécies são consideradas hematófagas, pois necessitam de sangue para a maturação de seus ovos (MAROLI *et al.*, 2013; YOUNG & DUNCAN, 1994), embora a autogenia (desenvolvimento de ovos sem haver repasto sanguíneo) ocorre na primeira oviposição em algumas espécies (WHO, 2010; RANGEL & LAINSON, 2003). Assim, picam uma variedade de animais vertebrados como mamíferos, aves e animais de sangue frio, tendo atividade hematofágica predominantemente noturna, mas há exceções, por exemplo, *Lutzomyia wellcomei*, é ativa principalmente durante o dia (SHARMA & SINGH, 2008; RANGEL & LAINSON, 2003).

As peças bucais dos flebotomíneos são curtas, medem entre 0,2 e 0,4 mm, não sendo possível uma penetração profunda na pele do hospedeiro por isso são “*pool feeders*”, ou seja, para obterem alimento as fêmeas dilaceram a pele do hospedeiro levando a hemorragia subcutânea sendo então o sangue ingerido em uma quantidade aproximada ao peso do inseto (0,1 a 0,6 mg), ou em volumes entre 0,1 µL a 1,0 µL, (ABASSI *et al.*, 2009; DABBA, *et al.*, 2004), podendo variar em relação a espécie. A picada produz uma pápula de cor rosa cercada por área eritematosa com cerca 10-20 mm em diâmetro (SHARMA &

SINGH, 2008; RANGEL & LAINSON, 2003). Ao se alimentarem de sangue, as fêmeas de flebotomíneos injetam saliva e PSG (*promastigote secretory gel*) na pele de seus hospedeiros, moléculas que possuem importantes papéis no processo de hematofagia e que, conseqüentemente, podem facilitar a infecção por *Leishmania* (ROGERS, 2012; RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2010; ROGERS & BATES, 2007; SACKS & KAMHAVI, 2001).

São encontrados em áreas de florestas, mas também em locais sem vegetação como áreas urbanas e cavernas, paredes com alta umidade e temperatura, embora eles possam ser observados em regiões secas nos locais com um microclima favorável como fendas, cavernas, buracos etc. Seus criadouros ocorrem em solo úmido, rico em matéria orgânica, folhas caídas e rochas, em tocas de animais, troncos de árvores, ninhos e ambientes antrópicos como: chiqueiros, galinheiros e outros ecótopos com condições apropriadas (WHO, 2010; SHARMA & SINGH, 2008; YOUNG & DUNCAN, 1994).

O voo dos flebotomíneos é muito característico, parecendo saltitar quando voam a curtas distâncias, em voo relativamente longo, este é firme e unidirecional (PESSÔA, 1978). Espécies florestais neotropicais raramente se dispersam a distâncias maiores que 1 km (WHO, 2010). Silva *et al.* (2013) em experimentos de marcação-soltura-recaptura, verificaram que os flebotomíneos são capazes de se dispersar a uma distância média de 73 m, atingindo 130 m em 24 h. Casanova *et al.* (2005) registraram um raio máximo de voo de 128 m. Resultados de Morrison *et al.* (1993) indicam que o comportamento de dispersão de populações de *L. longipalpis* peridomésticas pode ser comparado com espécies de flebotomíneos do Velho Mundo de habitats semelhantes, as quais podem se dispersar a uma distância igual ou superior a 0,5 Km.

2.6 TRANSMISSÃO DE *Leishmania* PELOS FLEBOTOMÍNEOS

O ciclo de vida de *Leishmania* (Figura 3B) se inicia quando o flebotomíneo realiza a hematofagia em um mamífero infectado. A ingestão de

sangue pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo induz a síntese de enzimas digestivas no intestino médio do inseto, incluindo tripsinas, quimiotripsinas, aminopeptidases e glicosidases e, a síntese da matriz peritrófica (KAMHAWI, 2006; SACKS & KAMHAWI, 2001). Tem-se mostrado que em flebotomíneos, a atividade de proteases no intestino médio aumenta após o repasto sanguíneo, atingindo um pico entre 24 e 48 h, com algumas variações dependentes da espécie. Algumas espécies de *Leishmania* podem desenvolver mecanismos para sobrepor os efeitos nocivos das enzimas digestivas, inibindo ou retardando o pico de atividade enzimática. Em *Phlebotomus papatasi* infectado com *L. major*, foi demonstrado um atraso ou diminuição significativa da atividade proteolítica no intestino médio do inseto (DILLON & LANE, 1993). O tipo de repasto sanguíneo e as espécies de *Leishmania* parecem também afetar a atividade proteolítica da espécie *Phlebotomus langeroni*. Daba *et al.* (1997) observaram uma redução na atividade enzimática e uma digestão mais lenta de proteínas nos insetos infectados com sangue contendo *L. (L.) infantum*, quando comparados a insetos alimentados somente com sangue ou com sangue contendo *L. (L.) major*.

O sangue infectado com *Leishmania* passa para a porção posterior do intestino médio e, por volta de 4 horas, é envolvido por um invólucro acelular que separa o alimento ingerido do epitélio intestinal, chamado de matriz peritrófica. Ela é constituída de quitina e proteínas secretadas pelo epitélio do intestino médio do inseto (KAMHAWI, 2009; BATES, 2007; SHAO *et al.*, 2001). As principais funções da matriz peritrófica em insetos hematófagos incluem prevenção de danos as microvilosidades intestinais pelo conteúdo alimentar; compartimentalização dos processos digestivos, atuando como uma barreira permeável às enzimas digestivas e forma uma barreira defensiva contra patógenos (SECUNDINO *et al.*, 2005; TERRA, 2001).

Macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* são ingeridos juntamente com o sangue do hospedeiro, ocorrendo mudanças nas condições da passagem do parasito do hospedeiro mamífero para o intestino médio do flebotomíneo, como diminuição da temperatura e aumento do pH, estes

desencadeiam transformações morfológicas e funcionais no desenvolvimento do parasita no intestino do inseto vetor (Figura 3A) (DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012; KAMHAWI, 2006).

As formas amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, as quais se replicam rapidamente pelas próximas 24 a 48 horas. Então, promastigotas procíclicas sofrem múltiplas divisões e, entre 48 e 72 horas, se diferenciam em promastigotas nectomonadas. Estes escapam da matriz peritrófica aderem ao epitélio intestinal e migram para colonizar o intestino anterior. Por volta do 4º e 7º dia, a digestão do sangue é completada (SACKS & KAMHAVI, 2001; SACKS, 2001), e a migração das promastigotas para região da cárdia (intestino torácico) e da válvula estomodeal continua até se formar um acúmulo de promastigotas atrás dessa estrutura. Uma vez na válvula do estomodeu, promastigotas nectomonadas se transformam em promastigotas leptomonadas. Algumas das promastigotas nectomonadas/leptomonadas se anexam à superfície da cutícula da válvula do estomodeu e se diferenciam em promastigotas haptomonadas. Finalmente, algumas das promastigotas leptomonadas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, as quais são as formas infectantes para os mamíferos (RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2010; BATES, 2007). O tempo necessário para que o parasito complete seu ciclo de vida no flebotomíneo é de aproximadamente 6 a 9 dias, dependendo da espécie (KAMHAVI, 2006).

Por meio do repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneo libera promastigotas metacíclicas por regurgitação na pele do hospedeiro mamífero. Estas infectam macrófagos, bem como outras células fagocíticas como, por exemplo, células dendríticas ou células não-fagocíticas, contudo, o mecanismo de entrada destes parasitas em células não-fagocíticas não está totalmente esclarecido (WALKER *et al.*, 2013; KIMA, 2007). Em seguida, se transformam em amastigotas no interior de um vacúolo parasitóforo, as quais proliferam-se por divisão binária e eventualmente sobrecarregam a célula infectada que conduz à sua ruptura, dessa forma, os amastigotas extracelulares podem reinfectar outros fagócitos.

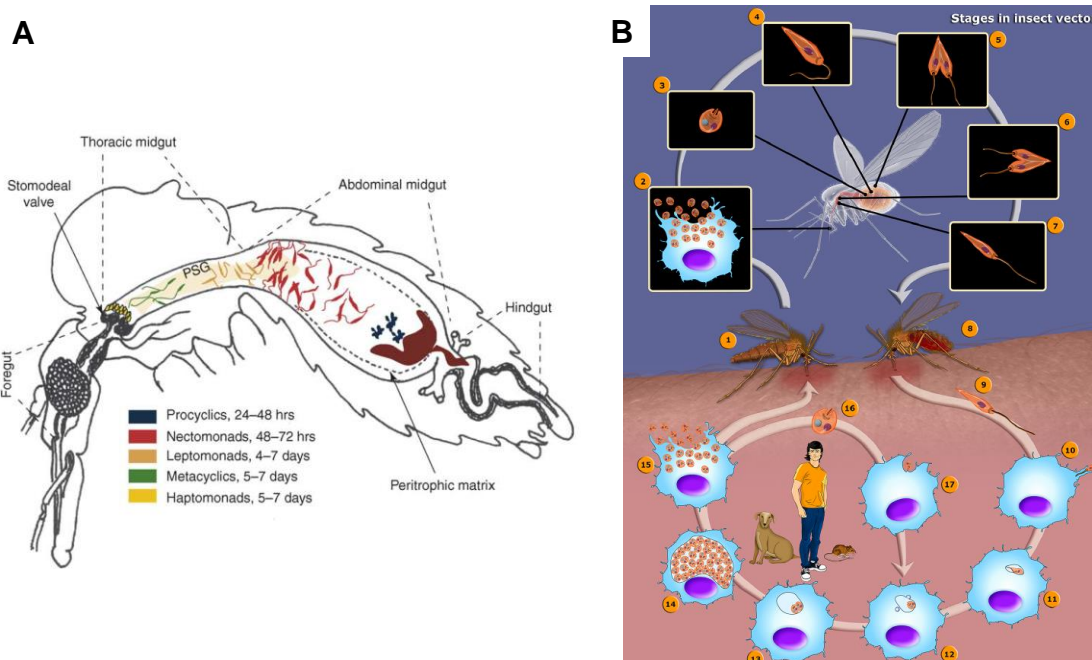


FIGURA 3. A. CICLO DE VIDA DE *LEISHMANIA* NO INTESTINO DO FLEBOTOMÍNEO, EVIDENCIANDO AS DIFERENTES FORMAS DE PROMASTIGOTAS. B. CICLO DE VIDA DE *Leishmania* NO HOSPEDEIRO VERTEBRADO.
 FONTE: A) KAMHAWI (2006); B) TEIXEIRA, *et al.* (2013)

Têm sido descrito que neutrófilos são recrutados para o local da picada do flebotomíneo, onde fagocitam as promastigotas de *Leishmania* proporcionando-lhes abrigo temporário, os quais são posteriormente fagocitados por fagócitos competentes como macrófagos e células dendríticas (WALKER *et al.*, 2013; CHARMOY *et al.*, 2009). Kimblin *et al.* (2008) estimaram que 10 a 100.000 promastigotas metacíclicas foram inoculados na orelha de um camundongo exposto a picada de um único flebotomíneo infectado.

2.7 RESERVATÓRIOS DE *Leishmania*

Protozoários do gênero *Leishmania* são capazes de infectar várias espécies de animais, algumas das quais podem ser reservatórios de infecção. Existem na literatura diferentes e contraditórios conceitos de reservatório (HAYDON *et al.*, 2002). Segundo o Ministério da Saúde (2007) reservatório é a

espécie ou o conjunto de espécies que garantem a circulação de um determinado parasito na natureza dentro de um recorte de tempo e espaço.

Os reservatórios primários de *Leishmania* são animais silvestres, sendo que nas Américas, mais de 40 espécies de mamíferos podem abrigar *Leishmania*, dentre os quais se destacam os grupos: Edentata, Carnivora, Rodentia, Primata, Marsupialia e Perissodactyla. Com o aumento da domiciliação do ciclo de transmissão da leishmaniose, animais domésticos e sinantrópicos têm assumido um importante papel na manutenção deste parasito em áreas de transmissão (DANTAS-TORRES, 2007), contudo, apenas poucos destes animais funcionam como reservatórios, atuando como fonte de infecção de flebotomíneos e assim, contribuindo para o estabelecimento de *Leishmania* nessas áreas (QUARESMA *et al.*, 2011).

Existem vários relatos de infecção por *Leishmania* em várias espécies de roedores e gambás (LIMA *et al.*, 2013; QUARESMA *et al.*, 2011; ROQUE *et al.*, 2010; SANTIAGO *et al.*, 2007; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003). Cães têm sido implicados como os principais reservatórios domésticos de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, o agente etiológico da leishmaniose visceral, mas parece ter um papel como reservatório doméstico na transmissão de *Leishmania braziliensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*, agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana (DANTAS-TORRES, 2007; REITHINGER & DAVIES, 1999).

A busca constante pela identificação dos reservatórios vertebrados naturais da leishmaniose cutânea e visceral tem sido um dos principais objetivos de estudos em focos naturais de transmissão em todo mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.8 IDENTIFICAÇÃO DE FONTES DE REPASTO

Estudos sobre os hábitos alimentares de insetos vetores são importantes para estimar a eficiência destes na transmissão dos agentes patogênicos. A grande maioria dos estudos de fonte de repasto de artrópodes tem sido

realizada abordando os vetores de patógenos de interesse em saúde pública ou de importância veterinária, como os flebotomíneos (JAOUADI *et al.*, 2013; KENT, 2009; HAOUAS *et al.*, 2007).

Investigações sobre o hábito alimentar dos flebotomíneos têm grande significado ecológico e epidemiológico, pois possibilita a identificação correta dos mamíferos que funcionem como possíveis reservatórios e da preferência alimentar do vetor, além disso, contribui para a elucidação do ciclo de transmissão natural em determinada área e permite desenvolver estratégias para o controle da doença (QUARESMA *et al.*, 2012; AFONSO *et al.*, 2012; ABASSI *et al.*, 2009; FONTELLES *et al.*, 2009).

Diferentes metodologias vêm sendo utilizadas para identificação de fontes alimentares de artrópodes vetores com intuito de avaliar adequadamente a sua preferência hematofágica. Dentre os métodos sorológicos, os mais utilizados baseiam-se em ensaios de antígeno-anticorpo como a precipitina, utilizada desde os primórdios de 1900, quando King e Bull, Rice e Barber adaptaram essa técnica para determinar a fonte alimentar em mosquitos e outros insetos. O teste de precipitina vem sendo utilizado como uma importante ferramenta para identificação de fontes de repasto sanguíneo de artrópodes vetores (SOUZA *et al.*, 2011; KENT, 2009; OLIVEIRA-PEREIRA *et al.*, 2008; KENT *et al.*, 2005; LOROSA *et al.*, 1998). Além deste, utiliza-se também a técnica de ELISA (MARASSÁ, *et al.*, 2013; AFONSO *et al.*, 2012; MARASSÁ *et al.*, 2004).

A técnica de espectrometria de massa que utiliza como matéria prima a hemoglobina dos hospedeiros vertebrados possibilita também a identificação de múltiplos repastos, inclusive aqueles posteriores a 96 horas da primeira alimentação, demonstrando considerável sensibilidade e acurácia. Entretanto, apresenta um maior custo em equipamento e manutenção (SILVA, 2006).

Recentemente, abordagens moleculares, com um grau mais elevado de sensibilidade e especificidade para a identificação de fontes de repasto sanguíneo têm sido desenvolvidas, como àquelas baseadas na PCR, sendo ferramentas importantes nessa área (PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2010). Existem diversos métodos dentre os quais se destacam: a técnica de PCR-

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), a amplificação e sequenciamento do gene citocromo b (QUARESMA *et al.*, 2012; SANT'ANNA *et al.*, 2008; KENT *et al.*, 2005), ensaios de mobilidade heteroduplex (ABBASI *et al.*, 2009) e PCR multiplex (SANT'ANNA *et al.*, 2008). Abbasi *et al.* (2009) identificaram fontes de repasto sanguíneo através do gene do citocromo b seguida pela análise de *Reverse Line Blotting* (RLB). O primeiro método baseado em PCR para identificar as fontes de repasto foi a amplificação do gene prepronociceptina (PNOC), o qual é utilizado em estudos filogenéticos de mamíferos (HAOUAS *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2001).

O processo de digestão do sangue proveniente do repasto no intestino dos flebotomíneos é um fator limitante no que diz respeito à detecção do DNA, devido à degradação por proteases. Tem sido relatado que dependendo da espécie de flebotomíneo, há um pico de atividade das proteases entre 24 e 48 horas após o repasto sanguíneo (DILLON *et al.*, 1993). Além disso, os flebotomíneos variam de tamanho e volume de sangue ingerido por eles durante a hematofagia (0,1 - 1,0 μ L) que é digerido rapidamente. Hemácias do sangue de mamíferos não contêm núcleo, característica que contribui por haver menor quantidade de DNA se comparado a sangue de aves, por exemplo (ABBASI *et al.*, 2009; DABA, *et al.*, 2004). Somente os flebotomíneos visualmente ingurgitados com sangue podem ser utilizados para a análise (SANT'ANNA *et al.*, 2008). Além disso, a presença de *Leishmania* também mostrou diminuir os níveis e atividade de proteases no intestino dos flebotomíneos (DILLON *et al.*, 1993).

2.9 O GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)

O gene nuclear de cópia única, o prepronociceptina (PNOC) (Figura 4A), é exclusivo de vertebrados e codifica o precursor proteico da Nociceptina/Orfanina FQ, um peptídeo associado à diferenciação celular neuronal e vias de dor. O gene que codifica a prepronociceptina em humanos é encontrado no cromossomo 8p (Figura 4B) e é predominantemente transcrito

no cérebro e na medula espinhal, mas também está presente no sistema imunitário humano, rim fetal e ovário humano (ZAVERI *et al.*, 2006; ZAVERI *et al.*, 2000; MOLLEREAU *et al.*, 1996). O gene PNOC é constituído por uma sequência de aminoácidos e possui uma estrutura dimensional muito semelhante à dos precursores dos peptídeos opioides, como a preprodinorfina, a preproencefalina, e a preproopiomielocortina, sugerindo que os quatro genes pertencem a uma mesma família, ou seja, tem uma origem evolutiva comum a dos opioides e que estes polipeptídios possam ter origens evolucionárias comuns (MOLLEREAU *et al.*, 1996).

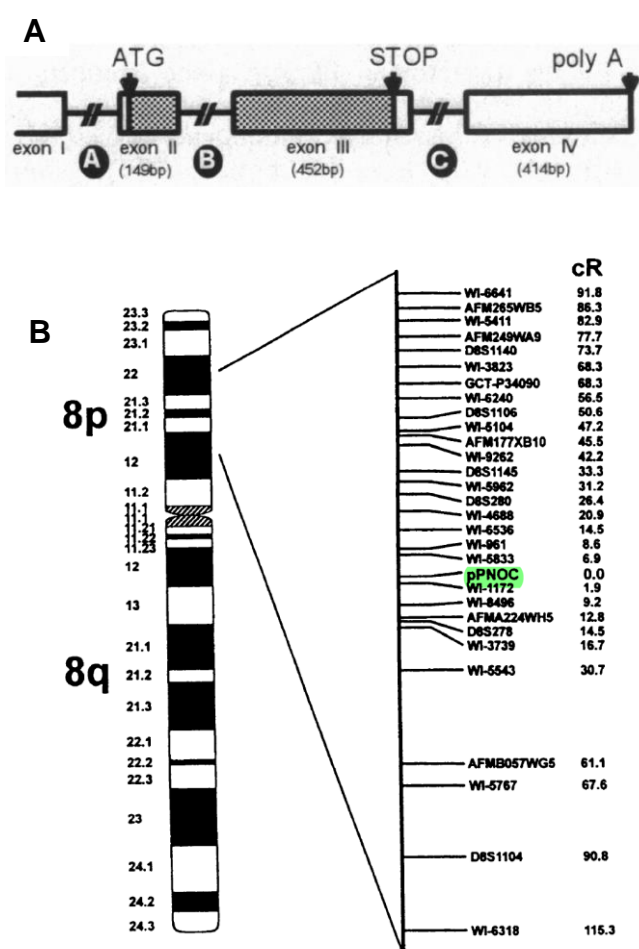


FIGURA 4. A) ORGANIZAÇÃO GERAL DO GENE PNOC. O GENE PNOC CONSISTE DE QUATRO ÉXONS (I A IV) INTERCALADAS POR TRÊS ÍNTRONS (A, B, E C). AS CAIXAS CHEIAS CORRESPONDEM A REGIÃO DE CODIFICAÇÃO. ATG, STOP, E POLI (A) É O INÍCIO DA TRANSCRIÇÃO, PARADA E SÍTIOS DE POLIADENILAÇÃO, RESPECTIVAMENTE. B) REPRESENTAÇÃO DO CROMOSSOMO HUMANO 8 E A LOCALIZAÇÃO DO GENE PNOC. FONTE: MOLLEREAU *et al.* (1996).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as fontes de repasto sanguíneo de *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* s.l. em área de transmissão de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado do Paraná, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar flebotomíneos em área endêmica de LTA no estado do Paraná.
- Identificar a fonte de repasto sanguíneo de fêmeas de *L. (N.) intermedia* s.l. por meio do teste de precipitina.
- Identificar a fonte de repasto sanguíneo de fêmeas de *L. (N.) intermedia* s.l. pelo sequenciamento do gene prepronociceptina (PNOC).
- Avaliar a sensibilidade e a reprodutibilidade dos iniciadores do gene PNOC (prepronociceptina) nas quantidades de 0,1 µL, a 2,0 µL de sangue de coelho (*Oryctolagus cuniculus*).
- Analisar o tempo de digestão do sangue em fêmeas de *L. (N.) neivai* (F1) alimentadas experimentalmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*), em períodos de 0, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após o repasto sanguíneo.

4 JUSTIFICATIVA

A compreensão dos aspectos da ecologia e do comportamento do vetor, especialmente os relacionados ao hábito alimentar, é essencial na epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana, pois, revela o grau de antropofilia dos flebotomíneos requisito para que uma espécie seja considerada como transmissora do parasito para os seres humanos (QUARESMA *et al.*, 2012; AFONSO *et al.*, 2012). Neste contexto a identificação das fontes de repasto sanguíneo e dos prováveis reservatórios, os quais mantêm o ciclo de transmissão do parasito, são elementos cruciais para a elucidação dos aspectos locais que envolvem a doença, pois possibilita compreender a ecologia e o comportamento do vetor, definir o grau de antropofilia e a atração para os reservatórios, identificar os mamíferos (possíveis reservatórios) que servem de fonte de repasto, entender o ciclo natural de transmissão de *Leishmania* em uma determinada área de estudo, uma vez que o seu comportamento sofre modificações de acordo com as alterações ambientais e a fonte de repasto que está disponível. Portanto, a caracterização dos hábitos alimentares dos flebotomíneos é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias de controle do vetor, visando à melhoria da qualidade de vida da população residente em áreas endêmicas.

Apesar da importância do Paraná no cenário da ACL, até agora não há nenhum estudo para determinar a fonte de repasto sanguíneo de flebotomíneos na região do Vale do Ribeira usando o gene prepronociceptina (PNOC), sendo este trabalho o primeiro na América Latina.

Com os resultados desse trabalho espera-se contribuir para um melhor conhecimento dos possíveis reservatórios naturais de *Leishmania* e fatores relacionados à sua transmissão, auxiliando na compreensão da epidemiologia da LTA, importante doença endêmica no estado do Paraná.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDO

As coletas para a identificação da fonte de repasto sanguíneo foram realizadas na localidade de Epitácio Pessoa (24°47'31" S e 48°59'28" W) no município de Adrianópolis, estado do Paraná (Figura 5). O município está situado a 250 m do nível do mar no nordeste do estado do Paraná, na divisa com o estado de São Paulo, ocupando uma área de 1.349,333 km² com uma população formada por 6.376 habitantes e densidade populacional de 4,7 hab/km² apresenta um Índice de Desenvolvimento Humano (IDH-M) de 0,667. A formação vegetal é composta pela mata atlântica, apresentando clima tropical quente com altas temperaturas no verão e amenas no outono e inverno, com altas precipitações (IBGE, 2013).

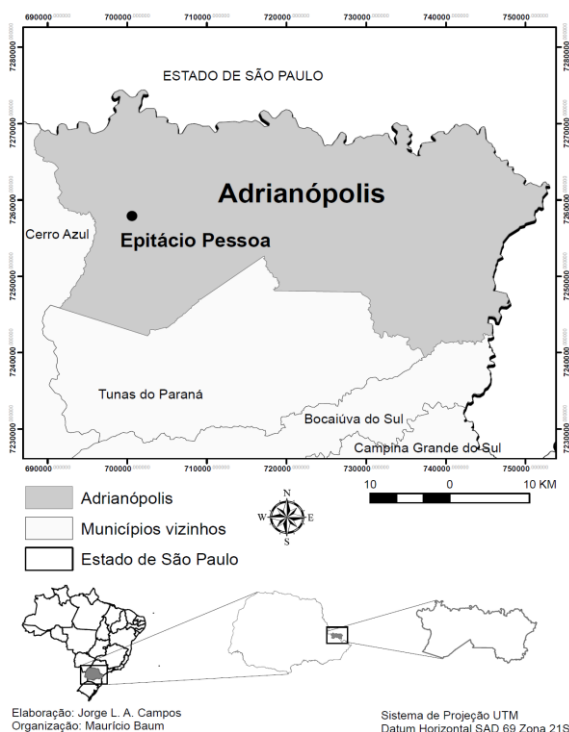


FIGURA 5 - ÁREA DE ESTUDO: EPITÁCIO PESSOA, MUNICÍPIO DE ADRIANÓPOLIS, ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

FONTE: O autor (2013)

5.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FLEBOTOMÍNEOS

5.2.1 Coleta de flebotomíneos para identificação da fonte de repasto sanguíneo

Foram realizadas três coletas para a identificação da fonte de repasto sanguíneo durante três semanas consecutivas no mês de janeiro de 2013, em duas propriedades rurais particulares na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, estado do Paraná, com auxílio de armadilhas de luz dos tipos CDC (*Control Disease Center*) montadas no peridomicílio, intradomicílio e na mata e, armadilha de Shannon no peridomicílio (Figura 6), as quais foram instaladas no período das 19:00 as 06:00 horas. Os insetos foram transportados até o Laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, acondicionados em uma caixa de isopor contendo gelo seco para interrupção do processo digestivo pela baixa temperatura (ABBASI *et al.*, 2009; SANT'ANNA *et al.*, 2008). Os espécimes capturados foram triados com auxílio de esteromicroscópio e dissecados para identificação específica seguindo a chave de identificação de Young e Duncan (1994).



FIGURA 6. ARMADILHA DE SHANNON (A) E CDC (B)
FONTE: O autor (2013)

5.2.2 Coleta de flebotomíneos para criação em laboratório e teste de digestão

Para a realização do teste de digestão do sangue em fêmeas ingurgitadas, foram realizadas coletas durante os meses de fevereiro a maio de 2013 pela equipe do laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Os insetos foram coletados, quinzenalmente no município de Rincão, estado de São Paulo. As capturas foram feitas por meio de capturador de Castro na parede de uma casa localizada há aproximadamente 60 m do rio Mogi-Guaçu. Os insetos foram acondicionados em gaiolas com estrutura de arame recobertas com um tecido fino, *voil*, as quais foram embaladas em plástico com algodão embebido em água (para manter a umidade) e levadas ao laboratório de Parasitologia, no Departamento de Ciências Biológicas da UNESP para criação.

5.3 CRIAÇÃO DE FLEBOTOMÍNEOS EM LABORATÓRIO

Os flebotomíneos adultos, coletados com a finalidade de servirem ao experimento de teste de digestão (item 5.13), foram criados no Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Departamento de Ciências Biológicas, os quais foram alimentados com uma solução saturada de açúcar (30%) oferecida *ad libitum*. A partir do dia seguinte à coleta em campo, foi então oferecido o repasto sanguíneo em Hamster (*Mesocricetus auratus*) anestesiados, para as fêmeas. Durante o efeito anestésico, o animal foi colocado, dentro da gaiola de tecido de náilon para exposição às picadas das fêmeas de flebotomíneos coletadas, por aproximadamente duas horas. Após o repasto sanguíneo as fêmeas foram individualizadas em tubos os quais possuíam o fundo coberto por gesso. Na parte superior dos tubos foi colocado um pedaço de algodão embebido em solução açucarada concentrada (açúcar refinado + água mineral), preparada diariamente, para alimentação das fêmeas. O monitoramento para

acompanhamento do ritmo das oviposturas, a troca de solução açucarada e manutenção da umidade foi feito diariamente.

Seguido a oviposição pelas fêmeas, estas foram separadas para identificação quanto à espécie, conforme chave taxonômica de Young e Duncan (1994). O desenvolvimento das fases imaturas (ovos, larvas e pupas) até a emergência dos adultos, aconteceu em potes com fundo de gesso e mantidos em insetário climatizado com temperatura de 25 (+- 1 °C), 80% de umidade relativa e fotoperíodo de 12 horas. A criação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Young *et al.* (1981) e Modi & Tesh (1983) com adaptações quanto à alimentação das larvas, a qual foi feita com terra vegetal (45%), fezes de coelhos (45%) e ração para peixe (10%).

Por volta do quarto dia após a emergência dos adultos, hamsters foram anestesiados com xilazina e quetamina e em seguida foram introduzidos na gaiola de manutenção por aproximadamente duas horas para a hematofagia das fêmeas. Após a alimentação estavam visivelmente alimentadas, ou seja, com o abdômen dilatado e avermelhado, foram delicadamente retiradas da gaiola por meio de um tubo transparente e transportadas para outra gaiola. Um total de 10 fêmeas foi retirado dessa segunda gaiola e individualmente colocadas em microtubos de 0,2 mL contendo álcool 70% para os períodos delineados para o experimento (0, 12, 24, 48, 72 e 96 h após o repasto sanguíneo) e posteriormente armazenados em freezer -20 °C (JAOUADI *et al.*, 2013; ABBASI *et al.*, 2009; SANT'ANNA *et al.*, 2008) até os próximos experimentos.

5.4 TESTE DE PRECIPITINA

O teste de precipitina manifesta-se por uma precipitação quando o soro precipitante e o antígeno homólogo são misturados em proporções adequadas. Quando o antígeno é colocado sobre o soro, forma-se uma superfície nítida de separação, a reação torna-se mais visível e se manifesta em ampla zona de concentrações dos reagentes.

Os insetos coletados para identificação da fonte de repasto por este método foram acondicionados em caixas de isopor contendo gelo seco, ainda no campo, para interrupção do processo digestivo. Após coleta e identificação específica (item 5.2.1) as fêmeas visivelmente ingurgitadas, com conteúdo intestinal sugestivo para sangue, foram individualizadas em microtubos 0,6 mL estéreis e armazenadas a seco até a realização do teste. A metodologia empregada foi de acordo com Lorosa *et al.* (1998), em que o tubo digestório dos espécimes foi retirado e o conteúdo intestinal triturado em salina a 0,85%. Este macerado foi deixado por 12 horas à temperatura entre 4 °C e 8 °C e logo após, centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm, e o sobrenadante foi confrontado com os antissoros de galinha, porco, cão, gato, cavalo, boi, gambá, tatu, roedor e humano os quais foram produzidos no Departamento de Entomologia da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

5.5 TESTE DE SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE PARCIAL DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)

Após extração do DNA (itens 5.7) de sangue de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) nos volumes de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µL foi realizada PCR (item 5.8) e eletroforese (item 5.9) para verificação da amplificação.

5.6 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE PARA POSSÍVEIS COMPONENTES INIBIDORES PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PNOC

Foi realizada diluição seriada de sangue de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) nos volumes de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µL em chelex 5%, e logo após submetidas à extração de DNA (item 5.7) juntamente com 1 flebotomíneo macho em cada amostra, e em seguida realizada PCR (item 5.8) e eletroforese (item 5.9) para verificação da amplificação.

5.7 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

Para a extração do DNA total, as fêmeas foram maceradas individualmente utilizando pistilo motorizado em 100 µL de chelex 5% (LOXDALE & LUSHAY, 1998), em seguida as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos, centrifugadas a 19500 g por 20 segundos e incubadas em banho-maria a 80 °C por 30 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 19500 g por 20 segundos, posteriormente foi retirado o sobrenadante e transferido para microtubos de 0,6 mL e acondicionados a -20 °C.

5.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Para a PCR foi utilizado os iniciadores do gene Prepronociceptina (PNOC), PNOC - F (5'GCATCCTTGAGTGTGAAGAGAA3') e PNOC - R (5'TGCCTCATAACTCACTGAACC3') (JAOUADI *et al.*, 2013; TUÍRAN, 2012; NINIO *et al.*, 2011; HAOUAS *et al.*, 2007). A reação de PCR incluiu 0,3 µL dos iniciadores [10 pmol], 2,5 µL de tampão de PCR [10X], 0,25 µL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) [10 mM], 1,0 µL de cloreto de magnésio [50mM], 0,3 µL de *Taq Platinum* DNA polimerase [5U/µL], 6 µL de DNA total e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. A programação do termociclador foi: um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 s de desnaturação, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 45 s, e extensão final de 72 °C por 5 min. O processo de amplificação foi realizado no termociclador *Biocycler*®. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Como controle negativo da reação, em um tubo que continha todos os reagentes foi adicionado DNA de flebotomíneo macho, e no controle positivo, foi adicionado DNA extraído de sangue de coelho (*Oryctolagus cuniculus*).

5.9 ELETROFORESE E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Os produtos amplificados pela PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,6%, imerso em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), corado pelo brometo de etídio e visualizado em um sistema de fotodocumentação GIBCO BRL UV *Transilluminator* TFX 35M sob luz ultravioleta.

A purificação do produto de PCR foi feita com a enzima ExoSap-IT (USB®), que permite a inativação dos iniciadores não incorporados e dNTPs não consumidos. A reação com ExoSAP-IT foi realizada utilizando 10 µL do produto de PCR e 2 µL de ExoSAP-IT incubado no termociclador a 37°C por 60 minutos e a 80°C por 15 minutos, para inativação da enzima.

5.10 SEQUENCIAMENTO

O produto de PCR purificado foi submetido à reação de sequenciamento para a qual foi utilizado o Kit *Big Dye Terminator* v3.1 (*Applied Biosystems*®) seguindo as seguintes concentrações: 3,0 µL de tampão [10X], 1 µL de *Big-Dye* v3.1, 0,5 µL de iniciador PNOC-F e PNOC-R [10 pmol], 5,5 µL de produto de PCR para o volume total de 10 µL. Em seguida as amostras foram submetidas à seguinte programação no termociclador: 1 ciclo de 96°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos à 96 °C por 15 segundos, 55 °C durante 5 segundos e 60 °C à 4 minutos.

Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados com Sephadex G-50 Superfine, em seguida sequenciadas em sequenciador automático *Applied Biosystems* 3500.

5.11 EDIÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (STADEN *et al.*, 2001) e no MEGA 5.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA *et al.*, 2011), que produz uma fita consenso para cada amostra. As sequências foram comparadas com sequências disponíveis no *GenBank* para avaliação da identidade, através do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*[®].

5.12 TESTE DE DIGESTÃO DE SANGUE DE *L. (N.) neivai* ALIMENTADAS ARTIFICIALMENTE EM HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)

Para a análise do tempo de digestão do sangue, fêmeas de *L. (N.) neivai* (geração F1), foram criadas no laboratório de Entomologia da Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP), em função da infraestrutura, conhecimento e material necessário para a criação desses insetos. As fêmeas de *L. neivai*, geração (F1) com a mesma idade fisiológica, foram alimentadas em hamster (*Mesocricetus auratus*) (item 5.3), nos períodos de 0, 12, 24, 48, 72, 96 h a partir do repasto sanguíneo. Após cada repasto, as fêmeas foram armazenadas em álcool 70% a -20 °C e encaminhadas ao laboratório de Parasitologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, no qual foi realizada a extração de DNA genômico (item 5.7) e PCR (item 5.8) utilizando o iniciador PNOG. Este teste foi realizado em dez fêmeas alimentadas em cada intervalo de tempo para garantir a reprodutibilidade da reação.

6 RESULTADOS

6.1 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE RESPASTO SANGUÍNEO PELO TESTE DE PRECIPITINA

Foram coletados 3.357 flebotomíneos para a identificação da fonte de repasto pelo teste de precipitina durante o período do estudo, sendo 864 fêmeas, dessas 862 (99,8%) pertenciam à espécie *L. (N.) intermedia* s.l (Lutz & Neiva, 1912), e dois espécimes foram classificados somente em nível de gênero *Lutzomyia*, devido à perda de caracteres morfológicos importantes para identificação específica, os quais representaram 0,2% do total de fêmeas. Foram capturadas 744 fêmeas (86,1%) no peridomicílio, seguido por 71 (8,2%) no domicílio e 49 (5,7%) na mata.

Do total de fêmeas submetidas ao teste de precipitina, 396 (45,8%) apresentaram reação a algum tipo de antissoro testado, sendo a maioria do tipo simples, ou seja, se alimentaram em apenas um hospedeiro (67,9%) e as demais foram reações cruzadas (32,1%) reagindo a dois tipos de antissoros de combinações variadas. 468 fêmeas (54,2%) não apresentaram reação aos antissoros testados. Das que apresentaram reações simples, 32,8% se alimentaram em ave, 9,6% gambá, 7,9% roedor, 5,6% humano, 4,6% cavalo, 4,6% cão, 2,0% boi e 1,0% gato (Tabela 1). As fêmeas encontradas alimentadas com sangue de mais de um hospedeiro apresentaram predominantemente as seguintes combinações: ave e roedor (5,8%), ave e gambá (4,8%), ave e cão (2,3%), ave e humano (2,3%), cavalo e cão (2,3%), roedor e gambá (2,0%) (Tabela 2).

TABELA 1 – REAÇÕES SIMPLES AOS DIFERENTES TIPOS DE ANTISSOROS VERIFICADOS PELO TESTE DE PRECIPITINA EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM EPITÁCIO PESSOA, ADRIANÓPOLIS, PARANÁ, BRASIL.

ANTISSORO	ECÓTOPO						TOTAL	
	INTRADOMICÍLIO		PERIDOMICÍLIO		MATA		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Ave	12	3,0	116	29,3	2	0,5	130	32,8
Gambá	1	0,2	36	9,1	1	0,2	38	9,6
Roedor	1	0,2	27	6,8	3	0,8	31	7,9
Humano	1	0,2	17	4,3	4	1,0	22	5,6
Cavalo	1	0,2	16	4,0	1	0,2	18	4,6
Cão	1	0,2	17	4,3	-	-	18	4,6
Boi	-	-	8	2,0	-	-	8	2,0
Gato	-	-	3	0,8	1	0,2	4	1,0
TOTAL	17	4,3	240	60,6	12	3,0	269	67,9

FONTE: O autor (2013).

TABELA 2 – REAÇÕES CRUZADAS AOS DIFERENTES TIPOS DE ANTISSOROS VERIFICADOS PELO TESTE DE PRECIPITINA EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM EPITÁCIO PESSOA, ADRIANÓPOLIS, PARANÁ, BRASIL.

ANTISSORO	ECÓTOPO						TOTAL	
	INTRADOMICÍLIO		PERIDOMICÍLIO		MATA		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Ave/roedor	1	0,2	21	5,3	1	0,2	23	5,8
Ave/gambá	2	0,5	16	4,0	1	0,2	19	4,8
Ave/cão	1	0,2	7	1,8	1	0,2	9	2,3
Ave/humano	3	0,8	5	1,3	1	0,2	9	2,3
Cavalo/cão	1	0,2	8	2,0	-	-	9	2,3
Roedor/gambá	2	0,5	6	1,5	-	-	8	2,0
Cavalo/ave	1	0,2	6	1,5	-	-	7	1,8
Ave/gado	1	0,2	4	1,0	2	0,5	7	1,8
Ave/gato	-	-	6	1,5	-	-	6	1,5
Roedor/cão	1	0,2	5	1,3	-	-	6	1,5
Humano/cão	-	-	3	0,8	1	0,2	4	1,0
Cavalo/humano	-	-	3	0,8	-	-	3	0,8
Boi/gato	-	-	3	0,8	-	-	3	0,8
Cavalo/boi	-	-	2	0,5	1	0,2	3	0,8
Roedor/cavalo	-	-	3	0,8	-	-	3	0,8
Cavalo/gambá	-	-	2	0,5	-	-	2	0,5
Gato/gambá	-	-	1	0,2	-	-	1	0,2
Gato/cão	-	-	1	0,2	-	-	1	0,2
Rato/boi	-	-	1	0,2	-	-	1	0,2
Cavalo/gato	-	-	1	0,2	-	-	1	0,2
Boi/cão	-	-	1	0,2	-	-	1	0,2
Roedor/gato	-	-	-	-	1	0,2	1	0,2
TOTAL	13	3,3	105	26,5	9	2,3	127	32,1

FONTE: O autor (2013).

6.2 TESTE DE SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE PARCIAL DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)

Todas as amostras testadas (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 μL) positivaram três vezes, apresentando um perfil de banda esperado correspondente a 330 pares de base (Figura 7), validando o processo de extração do DNA e mostrando a sensibilidade e a reprodutibilidade do gene PNOC, frente a um volume mínimo e máximo de sangue (0,1 e 2,0 μL , respectivamente).

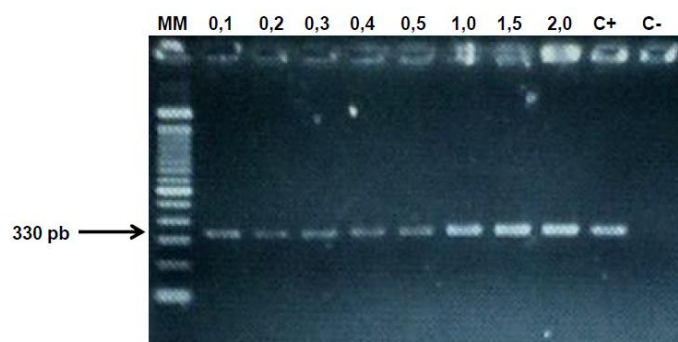


FIGURA 7: GEL REPRESENTATIVO DOS PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PNOC PARA TESTAR SUA SENSIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE. MM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PARES DE BASE); 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0: VOLUMES DE SANGUE EM μL ; C+: CONTROLE POSITIVO; C-: CONTROLE NEGATIVO.

FONTE: O autor (2013)

6.3 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE PARA POSSÍVEIS COMPONENTES INIBIDORES PARA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PNOC

Todas as amostras testadas três vezes (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 μL + flebotomíneo macho) positivaram, apresentando um perfil de banda esperado correspondente a 330 pares de base (Figura 8), validando o processo de extração do DNA.



FIGURA 8: GEL REPRESENTATIVO PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PNO PARA TESTAR A PRESENÇA DE INIBIDORES DE PCR. MM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PARES DE BASE); 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0: VOLUMES DE SANGUE EM μ L, JUNTAMENTE COM UM FLEBOTOMÍNEO MACHO CADA AMOSTRA; C+: CONTROLE POSITIVO; C-: CONTROLE NEGATIVO. FONTE: O autor (2013)

6.4 TESTE DE DIGESTÃO DE SANGUE DE *L. (N.) neivai* ALIMENTADAS ARTIFICIALMENTE EM HAMSTER (*Mesocricetus auratus*)

Por meio deste teste foi possível detectar a amplificação parcial do gene PNO de mamífero presente no conteúdo intestinal sanguíneo do inseto nos períodos de 0, 12 e 24 horas após o ingurgitamento (Figura 9), verificado pelos perfis de banda esperados correspondentes a 330 pares de base. Nenhuma amplificação ocorreu nos períodos de 48, 72 e 96 horas após a alimentação sanguínea, mostrando não ser possível detectar a fonte de repasto sanguíneo por meio da PCR utilizando o iniciador PNO após 24 horas do ingurgitamento nessas condições.

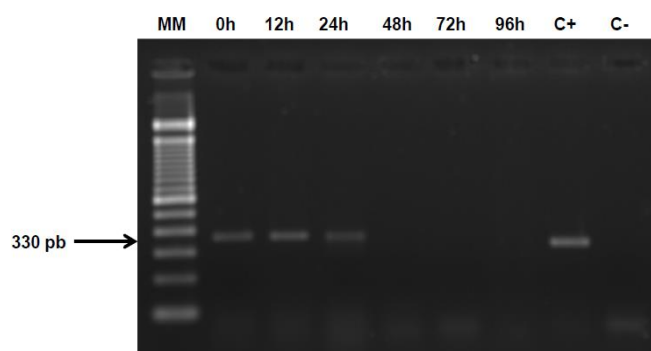


FIGURA 9: GEL REPRESENTATIVO PRODUTOS DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE PNO PARA O TESTE DE DIGESTÃO. MM: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PARES DE BASE); C+ = CONTROLE POSITIVO; C- = CONTROLE NEGATIVO. FONTE: O autor (2013)

6.5 IDENTIFICAÇÃO DE FONTE DE REPASTO SANGUÍNEO POR MEIO DA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PREPRONOCICEPTINA (PNOC)

Foram coletados 2.851 flebotomíneos para a identificação da fonte de repasto pela amplificação parcial do gene PNOC durante o período do estudo, sendo 1.263 fêmeas, todas pertencentes à espécie *L. (N.) intermedia* s.l. Foram capturadas 1.002 fêmeas (79,4%) no peridomicílio, seguido por 104 (8,2%) no domicílio e 157 (12,4%) na mata. Destas, 93 (3,26%) estavam ingurgitadas com conteúdo intestinal sugestivo para sangue (Figura 6).

Por meio do sequenciamento do gene PNOC foi possível identificar a fonte alimentar de 27 (29%) fêmeas ingurgitadas com sangue (Tabela 3). Todas as amostras amplificadas pela PCR do gene PNOC foram sequenciadas, editadas e comparadas com a base de dados do *GenBank* e foram com sucesso identificadas em nível de espécie com 99 a 100% de similaridade. Nenhum cromatograma apresentou sobreposição, sugerindo não ter ocorrido repastos mistos em nossa amostragem. Dos 27 espécimes sequenciados, 1 (3,7%) se alimentou em cavalo (*Equus caballus*), 16 (59,3%) em porco (*Sus scrofa*) e 10 (37%) em cão (*Canis lupus familiaris*).

TABELA 3 – IDENTIFICAÇÃO DA FONTE DE REPASTO SANGUÍNEO EM FLEBOTOMÍNEOS COLETADOS EM EPITÁCIO PESSOA, ADRIANÓPOLIS, PARANÁ, BRASIL, PELA AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE PNOC.

FONTE DE REPASTO	ECÓTOPO						TOTAL	
	INTRADOMICÍLIO		PERIDOMICÍLIO		MATA		Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
<i>Sus scrofa</i>	-	-	13	48,2	3	11,1	16	59,3
<i>Canis lupus familiaris</i>	-	-	9	33,3	1	3,7	10	37,0
<i>Equus caballus</i>	-	-	1	3,7	-	-	1	3,7
TOTAL	-	-	23	85,2	4	14,8	27	100,0

FONTE: O autor (2013).

7 DISCUSSÃO

O controle da LTA em áreas endêmicas exige um conhecimento profundo da ecologia de seus vetores, dos reservatórios e da sua interação com o protozoário *Leishmania*. Existe uma grande dificuldade para determinar os reservatórios deste parasito nas mais diversas áreas onde ele ocorre. Portanto, identificar o repasto sanguíneo de insetos vetores é fundamental para compreender seus hábitos alimentares, sua capacidade vetorial, os aspectos ecológicos relacionados à transmissão de *Leishmania* e ampliar o conhecimento sobre a epidemiologia da doença em uma determinada região endêmica, bem como criar medidas de controle mais efetivas.

A espécie *L. (N.) intermedia* foi considerada como pertencente a um complexo de espécies, sendo reconhecidas duas linhagens filogenéticas de *L. intermedia s.l.* (*L. intermedia s.s.* e *L. neivai*) ou *Nyssomyia intermedia* e *N. neivai* (MARCONDES, 1996; MARCONDES, 1997; ANDRADE FILHO *et al.*, 2003). Neste trabalho, na região do Vale do Rio Ribeira, optou-se por seguir a identificação segundo Young e Duncan (1994) e, por isso, a denominação de *Lutzomyia intermedia s.l. (sensu lato)*, enquanto que no estado de São Paulo a identificação baseou-se nas modificações já citadas, ficando *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai*.

A fauna flebotomínica coletada na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, Paraná, foi representada predominantemente pela espécie *L. (N.) intermedia s.l.* (99,8%) a qual foi encontrada em todos os ecótopos pesquisados: domicílio (86,1%), peridomicílio (8,2%) e mata (5,7%). Dois espécimes não puderam ser identificados a nível específico devido à perda de caracteres morfológicos durante a triagem. Estudos conduzidos por Castro *et al.* (2005), no Vale do Rio Ribeira, demonstraram que 97,5% dos insetos coletados pertenciam à espécie *L. intermedia*. Silva & Gomes (2001), também na região do Vale do Ribeira, mostrou que *Lutzomyia intermedia* representou 95,3% do total de flebotomíneos coletados em diversos ecótopos, demonstrando a nítida preferência desse complexo de espécies pelo ambiente que sofreu ação antrópica, sugerindo seu importante papel vetorial na

transmissão de *Leishmania* no Vale do Ribeira, bem como no sul do Brasil (PETERSON & SHAW, 2003).

O teste de precipitina revelou que *L. (N.) intermedia s.l* apresentou comportamento alimentar eclético, no período de estudo, pois os espécimes capturados alimentaram-se em vários animais domésticos e sinantrópicos, bem como em humanos. Das fêmeas de flebotomíneos coletadas, 32,8% se alimentaram em aves, as quais podem ter sido galinhas, porque eram as aves predominantes ao redor das propriedades estudadas. No entanto, é importante notar que, apesar das galinhas não sustentarem infecção com *Leishmania* (ALEXANDER *et al.*, 2002), estes animais servem como atração para o vetor e potenciais reservatórios de *Leishmania* para próximo das habitações, possibilitando a instalação e manutenção do ciclo de transmissão (RANGEL & LAINSON, 2003), tendo grande importância epidemiológica na leishmaniose. Além disso, verificamos que cada fonte alimentar sanguínea identificada foi coerente com os animais constatados no local de estudo. Muitos espécimes de flebotomíneos analisados apresentaram resultado negativo para o teste de precipitina, possivelmente indicando a ausência de relação direta com os antissoros testados, já que os testes foram feitos com antissoros de animais mais comumente encontrados na área de estudo. Outra possibilidade seria a ausência ou quantidade insuficiente de sangue no conteúdo intestinal ou a degradação pelo processo digestório.

Marassá *et al.* (2013) identificaram as fontes de repasto sanguíneo de *Nyssomyia intermedia* e *Nyssomyia neivai* no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. Os autores mostraram que os insetos se alimentaram em uma ou mais fontes de sangue, como: humano (23% e 36.8%), porco (47.4% e 26.4%), galinha (25.7% e 36.8%) e cão (3.9% e 0%) respectivamente. Já as que se alimentaram de mais de uma fonte, foi observado combinações diversificadas, mostrando o hábito oportunista dessas espécies.

O ecleticismo alimentar e a elevada porcentagem de espécimes de *L. intermedia s.l.* que apresentaram repastos múltiplos evidenciados neste estudo, pode ser explicado também pela dificuldade de se alimentar em um único hospedeiro, pois estes realizam movimentos para se defender ou devido a

pouca ou quase nenhuma exposição da pele do animal (BONGIORNO *et al.*, 2003). Além disso, se alguns espécimes de flebotomíneos estivessem infectados com *Leishmania* tenderiam a realizar mais repastos múltiplos devido ao dano que o parasita causa na válvula do estomodeu e ao bloqueio físico com PSG secretado por ele. A combinação destes dois eventos resulta na obstrução da porção anterior do intestino médio com um tampão de promastigotas de *Leishmania* e seu gel (PSG), que distende permanentemente e mantém aberta a válvula do estomodeu. Este fenômeno interfere no repasto sanguíneo e limita o volume de sangue que o flebotomíneo pode ingerir e, provavelmente, como consequência, os insetos infectados sondam a pele dos hospedeiros com mais frequência e passam mais tempo fazendo repasto sanguíneo, além de seu repasto ser incompleto se comparados àqueles não infectados (ROGERS, 2012; ROGERS & BATES, 2007).

Os ciclos de transmissão das leishmanioses dependem do movimento de seus possíveis reservatórios silvestres da mata para o peridomicílio, assim como, de humanos e animais domésticos para mata. A preferência do repasto de *L. (N.) intermedia s.l.*, aqui descrita, mostra que existe uma condição para a atração desses insetos no peridomicílio: a presença de animais domésticos que parece favorecer a presença de flebotomíneos, especialmente quando os animais domésticos são aves (galinhas). Além disso, as casas nesta região são construídas perto de vegetação, que inclui fragmentos de floresta onde vivem os insetos e reservatórios, principalmente roedores e marsupiais (LIMA *et al.*, 2013; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Essas condições, combinadas com a presença de humanos, para desenvolver diversas atividades, e animais domésticos na mata, como cães e porcos, podem permitir a transmissão de *Leishmania* na área de estudo.

Os testes de sensibilidade e reprodutibilidade dos iniciadores PNOC mostraram-se eficazes no que tange a detecção do DNA pela PCR, uma vez que obtivemos um padrão de banda esperado com a amplificação parcial do gene PNOC. É possível amplificar o DNA do conteúdo intestinal dos insetos coletados no campo, quando este não estiver totalmente digerido, para posterior identificação da fonte de repasto do flebotomíneo por meio do

sequenciamento do DNA. Ninio *et al.* (2011) amplificaram com sucesso um segmento do gene PNOC e conseguiram identificar a origem dos repastos derivados de vertebrados em *Culicoides*, assim como Haouas *et al.* (2007) obtiveram sucesso em identificar a fonte de repasto em flebotomíneos também utilizando o gene PNOC. Desta forma sugere-se que seja possível a aplicação deste método em outras espécies de artrópodes hematófagos, principalmente em vetores de importância médica.

Além do gene nuclear PNOC, outros marcadores têm sido utilizados com sucesso para identificar fontes de repasto sanguíneo em artrópodes vetores. Dentre eles está o gene mitocondrial, citocromo b (cytb) (GARLAPATI *et al.*, 2012; ABASSI *et al.*, 2009; NGO *et al.*, 2003; MALEKI-RAVASAN, 2009; OSHAGHI *et al.*, 2006) e o citocromo C oxidase 1 (COI) (ALCAIDE *et al.*, 2009; TOWNZEN *et al.*, 2008). Sendo o primeiro amplamente utilizado para esta finalidade.

Os flebotomíneos possuem uma variação de tamanho inter e intraespecífica, e o volume de sangue ingerido por eles durante a hematofagia pode variar de 0,1 µL a 1,0 µL, (ABASSI *et al.*, 2009; DABBA, *et al.*, 2004). Os iniciadores do gene PNOC puderam detectar neste trabalho a presença de DNA em um valor mínimo (0,1 µL) e um valor máximo (2,0 µL) de sangue testado. Apesar de os flebotomíneos serem insetos diminutos e, ingerirem uma quantidade baixa de sangue por ocasião do repasto, foi possível obter uma quantidade de DNA suficiente para a reação de PCR, pelo método de extração utilizando chelex 100®. Nagdev *et al.*, (2010) desenvolveu um protocolo para o isolamento de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* usando chelex-100® e comparou com o método convencional de extração com fenol/clorofórmio. O primeiro mostrou-se mais sensível, mais rápido e menos exigente tecnicamente comparado com o protocolo de extração com o segundo. Além disso, chelex 100® deve eliminar os inibidores potenciais de PCR, uma vez que é uma resina quelante de cátions: os íons carregados positivamente são capturados pela resina, enquanto que o DNA, negativamente carregado, permanece livre na solução (FISCHER *et al.*, 2004).

A identificação molecular bem sucedida do repasto sanguíneo depende da quantidade de sangue ingerido e do tempo de digestão no intestino do inseto (KENT *et al.*, 2005). A digestão do sangue no intestino dos flebotomíneos devido à degradação por proteases digestivas é um fator limitante no que diz respeito à detecção do DNA pela PCR, pois a degradação do DNA diminui a possibilidade da sua detecção em decorrência do tempo pós-ingestão (OSHAGHI *et al.*, 2006). O aumento da atividade das enzimas catalíticas no intestino dos flebotomíneos, reduz a sensibilidade da PCR para a identificação do repasto sanguíneo em flebotomíneos em decorrência do tempo em que o sangue permanece sob ação das proteases digestivas no intestino do inseto, desde o ingurgitamento até a realização da PCR (HAOUAIS, *et al.*, 2007).

Outro fator restritivo nesse processo de identificação de fontes de repasto através de métodos moleculares são os efeitos inibitórios de PCR por substâncias presentes nos tecidos dos insetos, majoritariamente em seu exoesqueleto, cabeça e tórax, que podem diminuir a eficiência da reação de PCR (PAIVA, 2007), e no sangue, como o heme (KENT, 2009). Evidenciou-se nos ensaios deste trabalho que houve a amplificação esperada do gene PNOC, não ocorrendo nenhuma interferência por parte de substâncias presentes no sangue e nos insetos, que possivelmente poderiam inibir a reação de PCR, o que demonstrou não ocorrer, nesse caso, resultados falso-negativos.

A identificação molecular da fonte de repasto sanguíneo por meio da amplificação do gene PNOC tem como aspecto mais importante a sua sensibilidade para detectar quantidades minúsculas de DNA presentes no sangue do hospedeiro proveniente do repasto sanguíneo dos flebotomíneos. Conforme confirmado por Haouas *et al.* (2007) a sensibilidade da detecção do gene PNOC em flebotomíneos silvestres capturados atingiu 79%. No presente trabalho foi possível identificar a fonte de repasto sanguíneo de 27 espécimes entre 93 que estavam ingurgitados. A não positividade pode ser explicada devido ao tempo em que o sangue, proveniente da fonte de repasto, ficou submetido às proteases digestivas, provavelmente acima de 24 horas conforme

evidenciado pelo teste de digestão apresentados neste trabalho ou o repasto foi realizado em animais não mamíferos, como aves por exemplo.

A significativa presença da espécie *L. intermedia* s.l e sua capacidade de adaptação aos ambientes modificados pelo homem, bem como a capacidade desta se alimentar em uma variedade de vertebrados (inclusive em humanos) e seu registro como importantes vetores de *Leishmania* são fatores de grande relevância epidemiológica na área. Desta forma, os resultados aqui apresentados podem auxiliar de forma significativa nos aspectos relacionados a eco-epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, PR.

8 CONCLUSÕES

- A elevada densidade de *L. intermedia* s.l. capturada sugere que esta seja a principal responsável pela transmissão de *Leishmania* em Epitácio pessoa, município de Adrianópolis PR.
- O teste de precipitina mostrou ser uma ferramenta simples, rápida e eficiente para identificação de fontes de repasto sanguíneo de flebotomíneos.
- *Lutzomyia intermedia* s.l. apresentou no período de estudo um caráter alimentar eclético, se alimentando de animais domésticos e sinantrópicos inclusive em humanos.
- Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a identificação da origem do repasto sanguíneo de flebotomíneos pelo método molecular está diretamente ligada ao nível de digestão do sangue e não a quantidade de sangue por eles ingerida, tampouco pela presença de agentes inibidores oriundos do sangue e do inseto.
- É possível utilizar o gene prepronociceptina (PNOC) como marcador para identificação de mamíferos que sirvam de fontes de repasto sanguíneo para flebotomíneos, demonstrando ser uma valiosa ferramenta de análise para esta finalidade.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados do presente estudo permitem propor estratégias para o controle da LTA na localidade de Epitácio Pessoa, município de Adrianópolis, PR, onde seria necessário a reorganização do ambiente, de modo a não oferecer um local propício para o desenvolvimento dos flebotomíneos, diminuindo também a disponibilidade de fontes de repasto sanguíneo a estes insetos, pois, existem condições no peridomicílio que servem como atrativos para os flebotomíneos e animais sinantrópicos que possam funcionar como reservatórios de *Leishmania*. Dentre eles se destacam a presença de animais domésticos e humanos na mata para desenvolver diversas atividades e as residências construídas próximas a fragmentos de mata, animais domésticos e seus abrigos, como galinheiro, pocilga, curral próximo às moradias, além de vegetação abundante, solo sombreado, úmido e com matéria orgânica são fatores que contribuem para o contato vetor/hospedeiro vertebrado na área de estudo.

REFERÊNCIAS

ABBASI, I.; CUNIO, R.; WARBURG, A. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 79-86, 2009.

AFONSO, M. M. S.; MIRANDA CHAVES, S. A.; RANGEL, E. F. Evaluation of feeding habits of haematophagous insects, with emphasis on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae), vectors of Leishmaniasis-Review. **Trends in Entomology**, v. 8, p. 125-136, 2012.

ALCAIDE, M. *et al.* Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. 1-9, 2009.

ALEXANDER, B. *et al.* Detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. **Acta Tropica**, v. 69, n. 1, p. 41-50, 1998.

ALEXANDER, B. *et al.* Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1480, 2002.

ANDRADE FILHO, J. D.; GALATI, E. A. B.; FALCÃO, A. L. Redescription of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1059-1065, 2003.

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, p. 1-8, 2008.

BONGIORNO, G. *et al.* Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. **Acta tropica**, v. 88, n. 2, p. 109-116, 2003.

BRANDÃO-FILHO, S. P. *et al.* Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.

BRITO, M. E. F. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425-429, 2012.

CASANOVA, C.; COSTA, A. I. P.; NATAL, D. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n. 7, p. 719-724, 2005.

CASTRO, E. A. *et al.* Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado

do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 445-52, 2002.

CASTRO, E. A. *et al.* Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta tropica**, v. 93, n. 2, p. 141-149, 2005.

CHARMOY, M. *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **BioMed Research International**, v. 2010, p. 1-8, 2009.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. In: Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings. **Nature Publishing Group**, p. 175-182, 2001.

COSTA, W. A. *et al.* Cascas de ovos como um fator de identificação de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vetores da leishmaniose tegumentar. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 1, p. 19-24, 2012.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Parasitárias**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CURTI, M. C. M. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 63-68, 2009.

DABA, S. *et al.* Vector-host-parasite inter-relationships in leishmaniasis. II. Influence of blood meal from natural vertebrate hosts with and without *Leishmania infantum* and *L. major* on the proteolytic activity in the gut of

Phlebotomus langeroni (Diptera: Psychodidae). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 639-649, 1997.

DABA, S. *et al.* A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sand fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 173, 2004.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155-159, 2011.

DEDET, J. P. Stages in the identification of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniasis and other tropical diseases. **Parasitologia**, v. 47, n. 3-4, p. 291-295, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DILLON, R. J.; LANE, P. Bloodmeal digestion in the midgut of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 7, n. 3, p. 225-232, 1993.

DO VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-8, 2005.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

DOUGALL, A. M. *et al.* Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. **International journal for parasitology**, v. 41, n. 5, p. 571-579, 2011.

FISCHER, A. *et al.* Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 16-20, 2004.

FONTELES, R. S. *et al.* Preferência alimentar sanguínea de *Lutzomyia whitmani* (Diptera, Psychodidae) em área de transmissão de leishmaniose cutânea americana, no Estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 647-650, 2009.

GARLAPATI, R. B. *et al.* Identification of Bloodmeals in Wild Caught Blood Fed *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) using Cytochrome b PCR and Reverse Line Blotting in Bihar, India. **Journal Of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 515-521, 2012.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.; Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 293–307, 2012.

HAOUAS, N. *et al.* Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. **The**

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 77, n. 6, p. 1054-1059, 2007.

HAYDON, D. T. *et al.* Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1468-1473, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e estatísticas. **IBGE cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=410020>>. Acesso em: 11/04/2013.

JAOUADI, K. *et al.* Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) Bloodmeal Sources in Tunisian Cutaneous Leishmaniasis Foci: Could *Sergentomyia minuta*, which is not an Exclusive Herpetophilic Species, be Implicated in the Transmission of Pathogens? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, n. 1, p. 79-85, 2013.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KENT, R. J.; Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 4-18, 2009.

KENT, R. J.; NORRIS, D. E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 336-342, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279, 1999.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal For Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087-1096, 2007.

KIMBLIN, N. *et al.* Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 29, p. 10125-10130, 2008.

LAINSON, R. *et al.* *Leishmania* and leishmaniasis. **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. v. 1, p. 83-124, 1986.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LEVINE, N. D. *et al.* A Newly Revised Classification of the Protozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 37-58, 1980.

LEWIS, D. J. *et al.* Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). **Systematic Entomology**, v. 2, n. 4, p. 319-332, 1977.

LIMA, B. S. *et al.* Small mammals as hosts of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 9, p. 592-597, 2013.

LOROSA, E. S. *et al.* Estudo da infecção natural e da fonte alimentar do *Triatoma sordida* (STAL, 1859), (Hemiptera-Reduviidae) na região norte de Minas Gerais, Brasil, através da reação de Precipitina. **Entomologia y Vectores**, v. 5, p. 13-22, 1998.

LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research-London**, v. 88, p. 577-600, 1998.

MALEKI-RAVASAN, N. *et al.* Blood meal identification in field-captured sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. **Journal of Arthropod-Borne Diseases (Formerly: Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases)**, v. 3, n. 1, 2009.

MARASSÁ, A. M. *et al.* Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 5, p. 547-554, 2013.

MARASSÁ, A. M.; CONSALES, C. A.; GALATI, E. A. B. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 441-446, 2004.

MARCONDES, C. B. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912), and resurrection of *L. neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 457-462, 1996.

MARCONDES, C. B. **Morfometria e DNA mitocondrial de populações sul americanas de *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas**. 1990 – 2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf>. Acesso em: 10/07/2013.

MIRANDA, R. N.; CUNHA, C.; SCHWEIDSON, J. A Leishmaniose Tegumentar no Paraná. **Revista Médica do Paraná**, v. 24, p. 1-21, 1955.

MODI, G. B.; TESH, R. B. A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 20, n. 5, p. 568-569, 1983.

MOLLEREAU, C. *et al.* Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 16, p. 8666-8670, 1996.

MORRISON, A. C. *et al.* Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 427-435, 1993.

MURPHY, W. J. *et al.* Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, v. 409, n. 6820, p. 614-618, 2001.

NAGDEV, K. J. *et al.* Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100 extracted DNA samples. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 8, p. 1032-1038, 2010.

NGO, K. A.; KRAMER, L. D. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 215-222, 2003.

NINIO, C. *et al.* Contribution to the knowledge of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 657-663, 2011.

OLIVEIRA, F. S. *et al.* PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 129, n. 3, p. 219-227, 2005.

OLIVEIRA-PEREIRA, Y. N. *et al.* Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 9, p. 2183-2186, 2008.

OSHAGHI, M. A. *et al.* Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 4, p. 232-236, 2006.

OSHAGHI, M. A.; CHAVSHIN, A. R.; VATANDOOST, H. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. **Experimental parasitology**, v. 114, n. 4, p. 259-264, 2006.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1-2, p. 173-174, 2009.

PAIVA, B. R. *et al.* Padronização de condições para detecção de DNA de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 87-94, 2007.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 537-42, 2010.

PESSÔA, S.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 919-931, 2003.

POINAR, J. R. G. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 635-637, 2007.

QUARESMA, P. F. *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579-585, 2011.

QUARESMA, P. F. *et al.* Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 480-485, 2012.

RAMALHO-ORTIGÃO, M.; SARAIVA, E. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. **Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 195-204, 2010.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 530-541, 1999.

ROGERS, M. E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 223, p. 1-13, 2012.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 91, 2007.

ROQUE, A. L. R. *et al.* *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 2, p. 589, 2010.

SACKS, D. L. *Leishmania*–sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189-196, 2001.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453-483, 2001.

SANT'ANNA, M. R. V. *et al.* Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. **Acta Tropica**, v. 107, n. 3, p. 230-237, 2008.

SANTIAGO, M. E. B. *et al.* An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007.

SANTOS, D. R. *et al.* Occurrence of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) in Paraná State, south of Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 298-301, 2009.

SECUNDINO, N. F. C. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 119-125, 2001.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 4, p. 255-72, 2008.

SILVA, A. M. *et al.* Diversity, distribution and abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Paraná state, southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 2, p. 209-225, 2008.

SILVA, A. C.; GOMES, A. C. Study of the vectorial competence of *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, Vianna, 1911. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 187-191, 2001.

SILVA, N. M. M. G. *et al.* Dispersal and memory of sand flies in an endemic area of cutaneous leishmaniasis, southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 986-993, 2013.

SILVA, V. C. **Identificação de Reservatórios de Zoonoses em Insetos Vetores por Espectrometria de Massa**. Tese de Doutorado - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SOUZA, R. C. M. *et al.* Feeding behavior of *Triatoma vitticeps* (Reduviidae: Triatominae) in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 16-22, 2011.

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 43, p. 303-322, 2001.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-4, 2013.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 47-61, 2001.

TOWNZEN, J. S.; BROWER, A. V. Z.; JUDD, D. D. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 22, n. 4, p. 386-393, 2008.

TUIRÁN, L. E. P. **Determinación molecular de las fuentes alimenticias de *Lutzomyia* spp.(Diptera: Psychodidae) asociadas a casos de Leishmaniasis Cutánea en el departamento de Sucre, Caribe Colombiano.** Dissertação de Mestrado - Sede Medellín, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 2012.

WALKER, D. M. *et al.* Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-19, 2013.

WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES. MEETING. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Media Centre/Fact Sheets/Leishmaniasis. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/>. Acesso em: 17/09/2013.

YOUNG, D. G.; PERKINS, P. V.; ENDRIS, R. G. A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 5, p. 446-446, 1981.

YOUNG, D. G.; DURAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae).** WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC, 1994.

ZAVERI, N. T.; GREEN, C. J.; TOLL, L. Transcriptional regulation of the human prepronociceptin gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 2, p. 710-717, 2000.

ZAVERI, N. T.; WALEH, N.; TOLL, L. Regulation of the prepronociceptin gene and its effect on neuronal differentiation. **Gene**, v. 384, p. 27-36, 2006.